

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.035

HOXB7 在胃癌组织中的表达及其临床意义

高玉芹¹ 周 斌² 刘战业³ 李新建⁴ 卫刚要²

(1 单县中心医院肿瘤科 山东 菏泽 274300; 2 单县中心医院胸外科 山东 菏泽 274303;

3 曹县人民医院胸外科 山东 菏泽 274400; 4 曹县人民医院心内科 山东 菏泽 274400)

摘要 目的:分析同源异型盒基因 B7(Homeobox B7, HOXB7)在人胃癌组织中的表达情况,并探讨 HOXB7 的表达与胃癌患者临床病理特征和预后的关系。**方法:**收集行手术切除的胃癌组织及对应癌旁组织共 120 例,采用实时定量 PCR(qRT-PCR)技术、蛋白印迹(Western blot)和免疫组化染色分别检测 HOXB7 mRNA 水平及蛋白水平在胃癌及对应癌旁组织中的表达,通过卡方检验分析 HOXB7 表达水平与胃癌患者临床病理因素间的相关性,采用单因素及多因素 Cox 回归模型评估 HOXB7 在胃癌风险评估中的作用,Kaplan-Meier 生存曲线分析 HOXB7 表达水平与胃癌患者无瘤生存期和总生存期的关系。**结果:**胃癌组织中 HOXB7 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于对应癌旁组织($P<0.05$);HOXB7 蛋白表达与肿瘤临床分期、浸润深度及淋巴结转移均具有显著相关性($P<0.05$),而与患者性别、年龄、分化程度及远处转移均无显著相关性($P>0.05$)。单因素和多因素 Cox 分析提示 HOXB7 可以作为评估胃癌患者预后的独立风险因素。Kaplan-Meier 生存分析结果显示高表达 HOXB7 的胃癌患者无瘤生存时间和总生存时间均显著低于 HOXB7 低表达患者组($P<0.01$)。**结论:**HOXB7 蛋白在胃癌组织中高表达,并与胃癌的恶性表型有关,可能参与胃癌发生及恶性进展过程,可作为判断胃癌患者预后的重要参考指标。

关键词:胃癌;HOXB7;临床意义;预后

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)05-955-05

Expression and Clinical Significance of HOXB7 in the Gastric Cancer

GAO Yu-qin¹, ZHOU Bin², LIU Zhan-ye³, LI Xin-jian⁴, WEI Gang-yao²

(1 Department of Oncology, Shanxian County Central Hospital, Heze, Shandong, 274300, China;

2 Department of Thoracic Surgery, Shanxian County Central Hospital, Heze, Shandong, 274303, China;

3 Department of Thoracic Surgery, Caonian People's Hospital, Heze, Shandong, 274400, China;

4 Department of Cardiology, Caonian People's Hospital, Heze, Shandong, 274400, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of HOXB7 (Homeobox B7) in human gastric cancer.

Methods: A total of 120 cases of gastric cancer tissues and matched tumor-adjacent tissues were used in this study. qRT-PCR, western blot and immunohistochemistry were used to evaluate the expression of HOXB7 mRNA and protein levels in gastric cancer tissues and matched tumor-adjacent tissues. Furthermore, the correlation of HOXB7 expression with the clinicopathological characteristics and the survival of gastric cancer patients were analyzed. Prognostic factors were examined by univariate and multivariate analyses using a Cox proportional hazards model. **Results:** Both the mRNA and protein expressions of HOXB7 were up-regulated in the gastric cancer tissues compared with those matched tumor-adjacent tissues ($P<0.05$). The expression of HOXB7 was significantly associated with the depth of tumor invasion, TNM stage and lymph nodes metastasis ($P<0.05$). There was no correlation of the HOXB7 expression with the gender, age, histology and distant metastasis ($P>0.05$). Moreover, univariate and multivariate analysis revealed that high HOXB7 expression was an independent risk factor for patients of gastric cancer. Furthermore, the disease-free survival rate (DFS) and overall survival rate(OS) in the high HOXB7 expression group was significantly lower compared with the low expression group ($P<0.01$). **Conclusion:** HOXB7 was significant highly expressed in the gastric cancer and the high expression of HOXB7 was shown to be associated with the malignant clinicopathological features and poor prognosis of gastric cancer patients. HOXB7 expression might be a new prognostic index and a new target molecular for the treatment of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; HOXB7; Clinical pathological; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-955-05

前言

作者简介:高玉芹(1978-),硕士研究生,主要研究方向:肿瘤的放化疗治疗,E-mail: gaoyinls@sina.com

(收稿日期:2017-04-23 接受日期:2017-05-18)

胃癌是常见恶性肿瘤之一,尤其在亚洲更为普遍^[1,2]。目前,胃癌患者通过手术治疗能获得很好的预后,然而中晚期胃癌患者由于发生肿瘤转移或者化疗耐药等原因使的大部分患者死亡率仍较高^[3,4]。因此,研究胃癌发生发展机制、探索新的诊断标志物以及预后评价指标对指导临床胃癌患者治疗方案制定和

改善患者预后都具有重要意义。Hox 基因是同源异型盒基因家族(homeobox gene family)中一类高度保守的压家族基因,在发育过程中调控一系列生物学过程包括凋亡,受体信号通路以及在肿瘤的发展中发挥关键作用^[9]。近年来 HOXB7 在人类恶性肿瘤中的功能逐渐被报道,有研究显示 HOXB7 在原发灶以及转移性的乳腺癌组织中高表达,提示在乳腺癌中发挥促进肿瘤发生和转移作用^[10]。最新的一项研究显示 HOXB7 高表达于胃癌原发灶和转移性胃癌组织中,敲低 HOXB7 的表达显著抑制胃癌细胞侵袭转移能力^[7]。以上研究结果提示 HOXB7 在恶性肿瘤的发生发展中可能发挥重要功能。本研究探讨了胃癌及对应癌旁组织中检测了 HOXB7 的表达情况,分析了 HOXB7 的表达水平与胃癌患者临床病理特征的关系及其对患者预后的影响,以期探讨 HOXB7 在胃癌中的作用和寻找新的药物靶点提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 组织样本

收集并筛选 2005 年 1 月到 2012 年 12 月在我院进行手术切除治疗的胃癌患者 120 例,所有病例均具有完整病理资料,包括患者随访资料,样本均由病理医生确诊。患者肿瘤复发时间和总生存时间采用电话随访方式获取,随访时间截止于 2015 年 5 月。胃癌及癌旁组织标本部分置于液氮冻存,一部分采用 4%甲醛固定后石蜡包埋。采用免疫组化和 western blot 检测其中 3 对胃癌组织与癌旁组织样本中 HOXB7 蛋白表达水平。通过 qRT-PCR 方法检测 120 例胃癌组织与癌旁组织样本中 HOXB7 mRNA 表达量水平。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 TRIzol, cDNA 反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒 SYBR prime script 均购自 Takara 公司;RIPA 蛋白裂解液购于碧云天公司;HOXB7 和 β -actin 基因引物有江苏金斯瑞生物科技有限公司合成;兔抗人—抗 HOXB7 单克隆抗体和 HRP 标记小鼠抗兔二抗均购自美国 abcam 公司;免疫组化试剂盒购于上海欣博盛生物科技有限公司。

1.3 免疫组化染色

组织经石蜡包埋后制作成 4 μ m 厚度切片,免疫组化步骤按试剂盒说明书操作。主要步骤包括:石蜡切片用二甲苯常规脱蜡、入水、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断和血清封闭后,加入 HOXB7(1:500)—抗室温孵育 1 h;PBS 清洗后,加入生物素化二抗室温孵育 10 min;PBS 清洗后加入链亲和素标记 HRP 后,经 DAB 显色液室温显色 2~5 min,自来水冲洗,苏木素复染,盐酸乙醇分化、脱水、透明,封片,镜检。

1.4 Western blot

组织样加入 RIPA 裂解液冰上裂解 1 h 提取样本总蛋白,上样相同质量的蛋白样品经 10 %聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,蛋白转印至 PVDF 膜;经 3%脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次后,加入 HOXB7(1:500)或者 β -actin (1:1000)—抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的二抗(1:2000)室温孵育 1.5 h;TBST 清洗 3 次,用 ECL 化学发光试剂检测 Western blot 结果。

1.5 qRT-PCR 检测

取适量液氮冻存组织标本于预冷研钵中迅速研碎,加入 1 mL TRIzol 提取试剂提取样本中总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA,按 qRT-PCR 说明书操作进行 PCR 扩增反应,HOXB7 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法以 β -actin 基因为内参计算 HOXB7 mRNA 在组织样本相对表达量。引物序列:HOXB7 上游引物 5'-GCGAGCGGGACAGATTGAC-3',下游引物 5'-TC-CATTTCTCTGGGCCTATC-3'; β -actin 上游引物 5'-A-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3',下游引物 5'-CAATAGT-GATGACCTGGCCGT-3'。样本分组标准如下:计算胃癌组织标本中 HOXB7 的相对表达量,并以所有样本的平均值将其分为高表达组和表达组。将大于平均值样本定义为 HOXB7 高表达组,共 69 例。小于平均值定义为 HOXB7 低表达组,共 51 例,统计分析 HOXB7 表达水平与胃癌患者临床病理特征和患者预后的关系。

1.6 统计学分析

统计学分析采用 SPSS20.0 软件。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。Kaplan-Meier log-rank 分析患者生存期,单因素和多因素分析采用 Cox 回归模型。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HOXB7 蛋白在胃癌组织中的表达

HOXB7 蛋白表达主要定位于细胞核。在癌旁正常组织中,HOXB7 染色较弱,阳性细胞比例为 $(8 \pm 1.2)\%$ (图 1A)。而在胃癌组织中 HOXB7 染色强度显著高于对应正常胃组织,其染色强度深,阳性细胞数量多,阳性细胞比例为 $(85 \pm 2.4)\%$ (图 1B)。对胃癌及癌旁组织标本 HOXB7 蛋白表达进行 Western blot 检测,胃癌组织中 HOXB7 蛋白表达量显著高于对应癌旁组织。以上结果提示 HOXB7 在胃癌组织中高表达,见图 1、图 2。

2.2 HOXB7 mRNA 在胃癌组织中的表达

对 120 例胃癌组织及对应癌旁组织中 HOXB7 mRNA 表达进行 qRT-PCR 检测,结果显示:胃癌组织中 HOXB7 mRNA 的表达量为 (2.88 ± 0.195) ,相对于癌旁组织表达量 (1.32 ± 0.092) 显著升高($P < 0.01$)。其中,120 例胃癌组织中,HOXB7 高表达有 69 例,低表达 51 例。见图 3。

2.3 HOXB7 表达水平与胃癌临床病理参数的关系

根据 120 例癌组织的 HOXB7 mRNA 平均表达值将患者分成高低表达两组。通过卡方检验对 HOXB7 高低组与胃癌患者临床病理因素相关性分析,结果显示胃癌组织中 HOXB7 表达水平与胃癌患者肿瘤浸润深度、临床分期和淋巴转移结均有显著相关($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、分化程度和远处转移均无显著相关性($P > 0.05$)。结果提示 HOXB7 在胃癌组织中的表达水平与胃癌的恶性表型密切相关。

2.4 HOXB7 表达水平与胃癌患者预后间的关系

进一步研究 HOXB7 表达水平与胃癌患者预后间的关系。首先,我们通过单因素和多因素风险回归模型分析 HOXB7 的表达水平与患者无瘤生存期和总生存期,结果如表 2 所示,HOXB7 在胃癌组织中的表达水平可以作为判断胃癌患者预后差的独立风险因素 ($p < 0.05$)。我们采用 Kaplan-Meier 分析 HOXB7 表达水平与胃癌患者无瘤生存期和总生存期间的关

系。结果如图4所示,高表达HOXB7的胃癌患者其中位无瘤生存时间为17个月,中位总生存时间为18.4个月,均显著低

于HOXB7低表达组患者的中位无瘤生存期(26.8, $p<0.01$)和中位总生存期(38, $p<0.01$)。

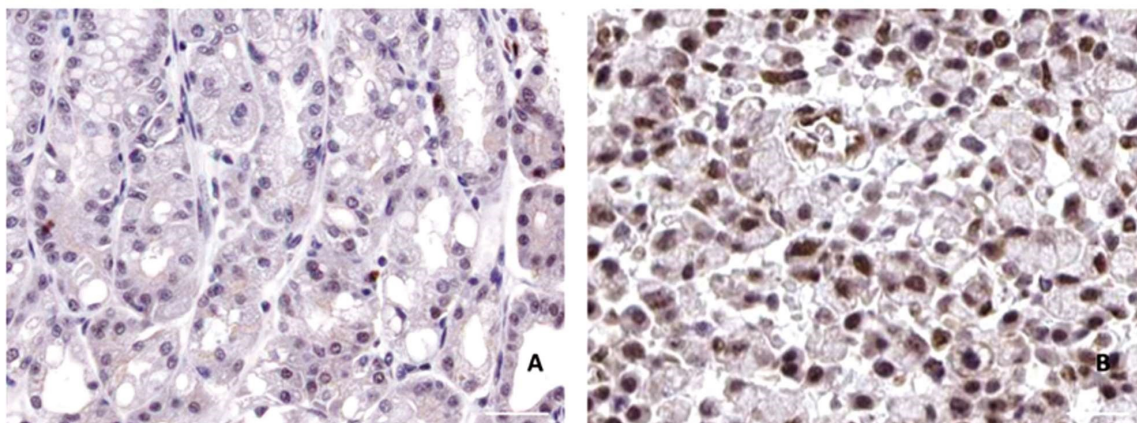


图1 免疫组化染色检测胃癌组织及正常胃组织中HOXB7表达水平

A, 胃癌组织; B, 癌旁正常组织。

Fig.1 Representative IHC images of HOXB7 expression in gastric cancer tissues and those matched tumor-adjacent tissues

A, gastric cancer tissues; B, tumor-adjacent tissues.

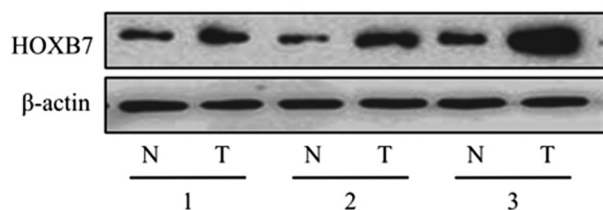


图2 Western blot 检测胃癌组织及对应的癌旁组织中HOXB7蛋白表达水平

T, 胃癌组织; N, 癌旁组织, β -actin 为内参。

Fig.2 HOXB7 expression in gastric cancer tissues and those matched tumor-adjacent tissues by western blotting

T, gastric cancer tissues; N, tumor-adjacent tissues; β -actin was used as an internal Control.

3 讨论

同源异型盒基因家族(homeobox gene family)成员均含有一个高度保守的同源异型盒,其编码转录调控因子蛋白序列具有保守性,在细胞的增殖分化中起着重要的调节作用^[8,9]。HOX基因的异常表达不仅会导致发育畸形,而且还与某些肿瘤的发生发展密切相关。例如,HOXA9的启动子通过超甲基化在肺癌中低表达,然而在急性淋巴瘤中却出现高表达状态^[10,11]。HOXB13在前列腺癌中低表达,而在乳腺癌中却出现高表达状态^[12,13]。近年来,HOXB7在多种实体瘤中的功能被报道,包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、胃癌以及肺癌^[14,15]。Liu S等发现过表达HOXB7能够促进肿瘤细胞发生上皮间质转化,进而促进乳腺癌细胞发生肺部转移,进一步的实验证实HOXB7通过发挥转录因子作用直接结合到TGF β 2启动子激活TGF β 信号通路^[16]。在结肠癌中,HOXB7的表达水平与肿瘤级别,远处转移以及患者总生存期均显著相关,进一步的机制研究揭示HOXB7通过PI3K/AKT和MAPK信号通路促进肿瘤细胞从G0期向S期转变^[17]。

在本研究结果显示胃癌组织标本中HOXB7表达呈现核

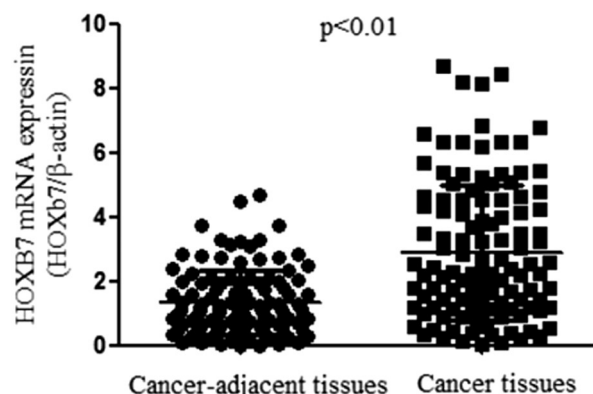


图3 qRT-PCR 检测胃癌组织及对应的癌旁组织中HOXB7 mRNA表达水平

HOXB7的相对表达量均以内参 β -actin的表达量进行均一化处理。

$P<0.05$ 具有显著性差异。

Fig.3 HOXB7 expression in gastric cancer tissues and those matched tumor-adjacent tissues by real-time PCR

The expression of HOXB7 was normalized by β -actin. $P<0.05$ was regarded as statistically significant.

定位,这与转录因子的定位一致。此外,HOXB7在胃癌组织中的mRNA和蛋白的表达量显著高于对应的癌旁组织,免疫组化结果显示HOXB7在胃癌组织细胞核中阳性高表达,提示HOXB7通过入核发挥发挥转录因子的调控功能。进一步进行HOXB7的表达与肿瘤患者临床特征和预后的关系分析,结果显示HOXB7在胃癌组织中的表达水平与胃癌患者的恶性病理特征如患者临床分期、浸润深度和淋巴转移均显著相关,这些实验结果与已有的HOXB7在胃癌中的功能报道一致^[18-20],提示HOXB7可能参与胃癌细胞迁移侵袭能力的调控。单因素和多因素分析提示HOXB7可以为评估胃癌患者预后的独立风险因素。生存分析发现高表达HOXB7的胃癌患者其无瘤生存时间和总生存时间均显著缩短,提示HOXB7表达水平与胃癌患者预后显著负相关。以上结果提示HOXB7在胃癌的发生

表 1 HOXB7 表达与胃癌临床病理特征的关系

Table 1 Correlation of HOXB7 expression with the clinical pathologic characteristics of patients with gastric cancer

Clinical pathologic characteristics	HOXB7 mRNA expression(n=120)		P
	Low expression(n=51)	High expression(n=69)	
Sex			
Male	29	44	0.443
Female	22	25	
Age,years			
≤ 60	19	33	0.247
>60	32	36	
Histology			
Well, moderately differentiated	25	32	0.774
Poorly differentiated	26	37	
TNM Stage			
I , II	30	25	0.014*
III, IV	21	44	
Depth of Invasion			
T1, T2	28	22	0.011*
T3, T4	23	47	
Distant metastasis(M) status			
M0	42	52	0.358
M1	9	17	
Lymph node Metastasis			
Absent	30	21	<0.01*
Present	21	48	

Note: P<0.05 was regarded as statistically significant.

表 2 单因素及多因素分析与胃癌患者无病生存期和总生存期相关的风险预测

Table 2 Uni-and Multivariate Analysis Risk Factors Associated with DFS and OS of pateints with Gastric Cancer

Variables	DFS				OS			
	Univariate	Analysis	Multivariate	Analysis	Univariate	Analysis	Multivariate	Analysis
	HR(95% CI)	P-value	HR(95% CI)	P-value	HR(95% CI)	P-value	HR(95% CI)	P-value
Sex(Malevs. Female)	1.342 (0.947-1.824)	0.453	-	-	1.521 (0.912-1.881)	0.631	-	-
Age(≤ 60vs.>60)	1.022 (0.812-1.154)	0.331	-	-	1.112 (0.891-1.675)	0.271	-	-
Differentiated degree (Well+ moderate vs poor)	0.875 (0.787-1.646)	0.451	-	-	1.243 (0.812-1.512)	0.463	-	-
Depth of Invasion (T1+T2vs. T3+T4)	1.012 (0.978-1.212)	0.051	-	-	1.543 (1.135-1.478)	0.132	-	-
TNM Stage(I + II vs. III+ IV)	1.734 (1.224-2.467)	0.021*	1.645 (1.347-2.346)	0.031*	1.467 (1.181-2.321)	0.035*	1.185 (1.004-1.789)	0.039*
Distant metastasis(Present vs. Absent)	1.201 (0.952-1.479)	0.174	-	-	1.576 (1.312-2.671)	0.014*	1.445 (1.134-1.946)	0.024*
Lymph node Metastasis (Present vs. Absent)	1.469 (1.124-1.946)	0.031*	1.544(1.215 -2.014)	0.018*	1.758 (1.436-2.846)	0.012*	1.101 (1.014-1.434)	0.034*
HOXB7expression(High vs. Low)	1.549(1.227 -2. 023)	0.035*	1.645(1.216 -2.124)	0.041*	1.834 (1.246-2.496)	0.022*	1.814 (1.535-2.679)	0.034*

Note: HR, hazard risk ratio; CI, confidence interval 95%. P value<0.05 was regarded as statistically significant.

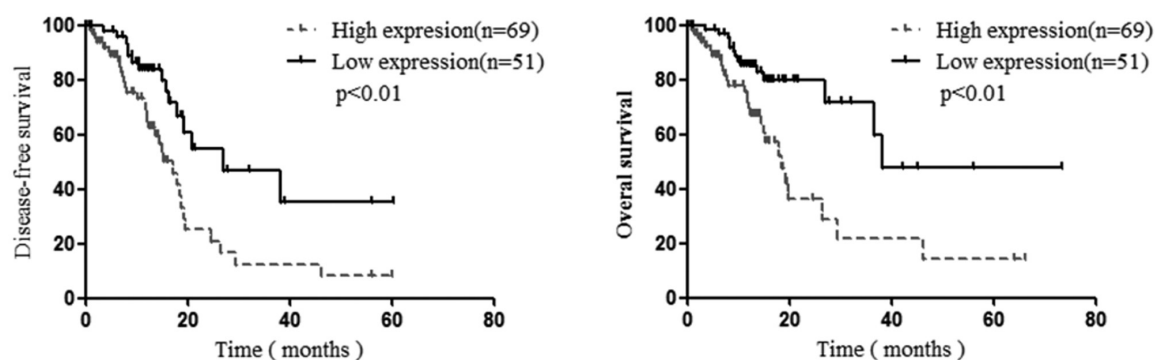


图4 Kaplan-Meier 无瘤生存期及总生存时间分析

P<0.05 具有显著差异

Fig.4 Kaplan-Meier analysis for DFS and OS of patients with gastric cancer according to HOXB7 expression

P<0.05 was regarded as statistically significant.

发展中具有重要作用,其表达水平可以作为判断胃癌患者预后的重要指标。因此,HOXB7 在胃癌恶性进展中发挥重要功能,其机制可能是 HOXB7 入核发挥转录因子进而调控致癌相关基因转录表达,其具体功能和机制有待进一步实验证明。

综上所述,HOXB7 在胃癌组织高表达,HOXB7 的表达水平与胃癌恶性临床病理特征及患者预后水平密切相关,可作为预测胃癌患者预后的重要指标。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917
- [2] Brenkman HJ, Haverkamp L, Ruurda JP, et al. Worldwide practice in gastric cancer surgery [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22 (15): 4041-4048
- [3] Uedo N, Iishi H, Tatsuta M, et al. Longterm outcomes after endoscopic mucosal resection for early gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2006, 9 (2): 88-92
- [4] Brower V. Apatinib in treatment of refractory gastric cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2016
- [5] Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 361-371
- [6] Chen H, Lee JS, Liang X, et al. Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression and lung metastasis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3637-3644
- [7] Joo MK, Park JJ, Yoo HS, et al. The roles of HOXB7 in promoting migration, invasion, and anti-apoptosis in gastric cancer [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(10): 1717-1726
- [8] Wang Y, Dang Y, Liu J, et al. The function of homeobox genes and lncRNAs in cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1635-1641
- [9] Rodrigues MF, Esteves CM, Xavier FC, et al. Methylation status of homeobox genes in common human cancers[J]. *Genomics*, 2016
- [10] Rauch T, Wang Z, Zhang X, et al. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(13): 5527-5532
- [11] Adamaki M, Lambrou GI, Athanasiadou A, et al. HOXA9 and MEIS1 gene overexpression in the diagnosis of childhood acute leukemias: Significant correlation with relapse and overall survival[J]. *Leuk Res*, 2015, 39(8): 874-882
- [12] Jung C, Kim RS, Lee SJ, et al. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 3046-3051
- [13] Shah N, Jin K, Cruz LA, et al. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ERalpha and inducing IL-6 expression [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (17): 5449-5458
- [14] Errico MC, Jin K, Sukumar S, et al. The Widening Sphere of Influence of HOXB7 in Solid Tumors [J]. *Cancer Res*, 2016, 76 (10): 2857-2862
- [15] Kar SP, Tyrer JP, Li Q, et al. Network-Based Integration of GWAS and Gene Expression Identifies a HOX-Centric Network Associated with Serous Ovarian Cancer Risk [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(10): 1574-1584
- [16] Liu S, Jin K, Hui Y, et al. HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGFbeta signaling pathway[J]. *Cancer Res*, 2015, 75 (4): 709-719
- [17] Liao WT, Jiang D, Yuan J, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11): 3569-3578
- [18] Tu W, Zhu X, Han Y, et al. Overexpression of HOXB7 is associated with a poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(5): 2967-2973
- [19] Cai JQ, Xu XW, Mou YP, et al. Upregulation of HOXB7 promotes the tumorigenesis and progression of gastric cancer and correlates with clinical characteristics[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 1641-1650
- [20] Joo MK, Park JJ, Chun HJ. Impact of homeobox genes in gastrointestinal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(37): 8247-8256